Test Progensa PCA3

Pour diagnostic *in vitro*.

Réservé à l'exportation américaine.

Informations générales 2
Usage prévu 2
Résumé et explication du test 2
Principes de la procédure 2
Réactifs et matériels fournis 4
Matériels 8
Avertissements et précautions 10
Conditions de conservation et de manipulation 13
Collecte, transport et conservation des échantillons 14
Procédure de test 16
Remarques concernant la procédure 22
Procédures de contrôle de qualité 26
Interprétation des résultats 27
Limites 32
Caractéristiques des performances 33
Bibliographie 39

Informations générales

Usage prévu

Le test Progensa PCA3 est un test d'amplification de l'acide nucléique (NAAT) *in vitro* qui détecte l'acide ribonucléique (RNA) du gène 3 (PCA3) du cancer de la prostate dans les échantillons d'urine masculins afin de générer un PCA3 Score. Le PCA3 Score est conçu pour être utilisé en conjonction avec les algorithmes de diagnostic conformes aux normes de soin pour faciliter le diagnostic du cancer de la prostate.

Résumé et explication du test

L'utilisation du test de l'antigène prostatique spécifique (PSA) sérique pour le dépistage du cancer de la prostate a permis la biopsie de tumeurs plus petites auparavant indétectables (1), créant ainsi un nouveau dilemme en matière de diagnostic: seule une fraction des hommes dont les taux de PSA sérique sont élevés ont un cancer de la prostate détectable. Les hommes ayant au moins une biopsie négative ont souvent un PSA sérique constamment élevé, dû généralement à une hypertrophie de la prostate ainsi qu'à des hyperplasies prostatiques bénignes (HPB). Néanmoins, une proportion significative d'hommes ayant un PSA sérique légèrement élevé (2,5-4,0 µg/L) ont ou développeront un cancer de la prostate significatif sur le plan clinique (1). Bien que la biopsie demeure la norme de référence pour la détection du cancer de la prostate, des tests plus précis et d'une meilleure spécificité sont nécessaires avant de décider d'effectuer une biopsie de la prostate.

Le PCA3 (également nommé « $PCA3^{DD3}$ » ou « $DD3^{PCA3}$ ») est un RNA spécifique à la prostate, non codant, qui est hautement surexprimé dans les cellules prostatiques cancéreuses, avec un niveau médian 66 fois plus élevé que dans les tissus bénins adjacents (2). En revanche, l'expression du gène PSA est similaire dans les cellules malignes et les cellules bénignes ; les taux de RNA du PSA peuvent ainsi être utilisés pour normaliser la quantité d'acide ribonucléique (RNA) spécifique à la prostate dans les échantillons de test moléculaires. La faisabilité des tests moléculaires quantitatifs basés sur le PCA3 des sédiments urinaires (2) et de l'urine non centrifugée (3) a été démontrée.

Le test Progensa PCA3 utilise l'urine non centrifugée collectée après un toucher rectal (TR) consistant en trois effleurages par lobe. Le TR libère les cellules prostatiques via le système du canal prostatique dans les voies urinaires où elles peuvent être recueillies dans l'urine de premier jet. L'urine est traitée par l'ajout de Moyen de transport d'urine (UTM), qui lyse les cellules et stabilise le RNA. Les RNA des PCA3 et PSA sont quantifiés, et le PCA3 Score est déterminé en se basant sur le ratio des RNA de l'expression PCA3/PSA. Outre qu'il normalise le signal PCA3, le dosage du RNA du PSA sert également à confirmer que la libération du RNA spécifique à la prostate est suffisante pour générer un résultat valide. Des PCA3 Scores plus élevés présentent une corrélation avec une probabilité de biopsie positive de la prostate plus importante.

Principes de la procédure

Le test Progensa PCA3 se compose de deux tests quantitatifs d'amplification de l'acide nucléique. Le test Progensa PCA3 associe les technologies de capture de cible, de TMA (Transcription Mediated Amplification) et du test de protection contre l'hybridation (HPA) pour, respectivement, simplifier le traitement des échantillons d'urine, amplifier le RNA cible et détecter l'amplicon.

Lorsque le test Progensa PCA3 est réalisé en laboratoire, les molécules du RNA cible sont isolées des échantillons d'urine par capture de cible. Les oligonucléotides (« oligonucléotides de capture ») qui sont complémentaires aux régions spécifiques de la séquence des cibles sont hybridés aux cibles dans l'échantillon d'urine. Un oligonucléotide de capture distinct est utilisé pour chaque cible. La cible hybridée est ensuite capturée sur des microparticules magnétiques qui sont séparées de l'échantillon d'urine dans un champ magnétique. Des étapes de lavage sont effectuées pour éliminer les composants exogènes du tube réactionnel. La séparation magnétique et les étapes de lavage ont lieu avec un système de capture de cible.

L'amplification de cible se produit via la TMA, une méthode d'amplification de l'acide nucléique basée sur la transcription qui utilise deux enzymes : la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV) et la polymérase RNA T7. On utilise un seul jeu d'amorces pour chaque cible. La transcriptase inverse sert à générer une copie d'acide désoxyribonucléique (DNA) (contenant un site promoteur de la polymérase RNA T7) de la séquence de la cible. La RNA polymérase T7 produit de multiples copies de l'amplicon du RNA à partir de la matrice de copie du DNA.

La détection s'effectue au moyen du test HPA avec des sondes monocaténaires et chimiluminescentes d'acide nucléique marqué et qui sont complémentaires à l'amplicon. Des sondes distinctes sont utilisées pour chaque amplicon cible. Les sondes d'acide nucléique marquées s'hybrident spécifiquement à l'amplicon. Le réactif de sélection différencie les sondes hybridées de celles qui ne le sont pas en désactivant le marqueur sur les sondes non hybridées. Lors de l'étape de détection, un signal chimiluminescent produit par la sonde hybridée est mesuré dans un luminomètre et transcrit en Unités relatives de lumière (RLU).

Les RNA du PCA3 et du PSA sont quantifiés dans des tubes distincts et le PCA3 Score est établi. Des calibrateurs contenant des quantités connues de transcrits RNA de PCA3 ou PSA sont inclus dans chaque série de test et utilisés pour générer une courbe standard. Des contrôles PCA3 et PSA sont également inclus pour vérifier la précision des résultats interpolés à partir de la courbe standard.

Réactifs et matériels fournis

Remarque : *Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.*

Les réactifs et le matériel fournis dans le Progensa PCA3/PSA Assay Kit pour le test Progensa PCA3 sont indiqués ci-dessous. Les symboles d'identification des réactifs sont également indiqués à côté du nom du réactif.

Progensa PCA3 Assay Kit, 2 x 100 réactions, référence 302355 (8 boîtes)

Kit Progensa PCA3 100 réactions

Boîte réfrigérée Progensa PCA3 — Conserver entre 2 °C et 8 °C dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
A	**Réactif d'amplification PCA3** *Acides nucléiques non infectieux déshydratés dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.*	1 flacon
E	**Réactif enzymatique PCA3/PSA** *Transcriptase inverse et polymérase RNA déshydratées dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.*	1 flacon
P	**Réactif de sonde PCA3** *Sondes DNA chimiluminescentes non infectieuses déshydratées dans une solution tamponnée de succinate contenant <5 % de réactif diluant et <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.*	1 flacon

Boîte à température ambiante Progensa PCA3 — Conserver entre 15 °C et 30 °C dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
AR	**Solution de reconstitution pour amplification PCA3** *Solution aqueuse contenant des conservateurs (<1 % de parabènes).*	1 x 9,3 mL
ER	**Solution de reconstitution enzymatique PCA3/PSA** *Solution tamponnée HEPES contenant un surfactant (10 % Triton X-100) et 20 % de glycérol.*	1 x 3,3 mL
PR	**Solution de reconstitution pour sonde PCA3/PSA** *Solution tamponnée de succinate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.*	1 x 12,4 mL
S	**Réactif de sélection PCA3/PSA** *Solution tamponnée de borate contenant un surfactant (1 % Triton X-100).*	1 x 31 mL
TCR	**Réactif Target Capture PCA3** *Acide nucléique non infectieux dans une solution tamponnée HEPES contenant une phase solide.*	1 x 22 mL
	Cartes de protection	1 paquet
	Collets de reconstitution	1 paquet

Kit de calibrateurs et contrôles Progensa PCA3 — Conserver entre 2 °C et 8 °C dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
CAL	**Calibrateur 1 PCA3** *Solution tamponnée de phosphate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.*	1 x 2,0 mL
CAL	**Calibrateurs 2-5 PCA3** *Acide nucléique PCA3 non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.*	4 x 1,7 mL
PC	**Contrôles positifs PCA3** *Acide nucléique PCA3 non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.*	2 x 1,7 mL
	Fiche d'informations sur la concentration PCA3	1 fiche

Kit Progensa PSA 100 réactions

Boîte réfrigérée Progensa PSA — Conserver entre 2 °C et 8 °C dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
A	**Réactif d'amplification PSA** *Acides nucléiques non infectieux déshydratés dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.*	1 flacon
E	**Réactif enzymatique PCA3/PSA** *Transcriptase inverse et polymérase RNA déshydratées dans une solution tamponnée HEPES contenant <10 % de réactif diluant.*	1 flacon
P	**Réactif de sonde PSA** *Sondes DNA chimiluminescentes non infectieuses déshydratées dans une solution tamponnée de succinate contenant <5 % de réactif diluant et <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.*	1 flacon

Boîte à température ambiante Progensa PSA — Conserver entre 15 °C et 30 °C dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
AR	**Solution de reconstitution pour amplification PSA** *Solution aqueuse contenant des conservateurs (<1 % de parabènes).*	1 x 9,3 mL
ER	**Solution de reconstitution enzymatique PCA3/PSA** *Solution tamponnée HEPES contenant un surfactant (10 % Triton X-100) et 20 % de glycérol.*	1 x 3,3 mL
PR	**Solution de reconstitution pour sonde PCA3/PSA** *Solution tamponnée de succinate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.*	1 x 12,4 mL
S	**Réactif de sélection PCA3/PSA** *Solution tamponnée de borate contenant un surfactant (1 % Triton X-100).*	1 x 31 mL
TCR	**Réactif Target Capture PSA** *Acide nucléique non infectieux dans une solution tamponnée HEPES contenant une phase solide.*	1 x 22 mL
	Cartes de protection	1 paquet
	Collets de reconstitution	1 paquet

Kit de calibrateurs et contrôles Progensa PSA — Conserver entre 2 °C et 8 °C dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
CAL	**Calibrateur 1 PSA** *Solution tamponnée de phosphate contenant <5 % de sulfate de lauryle et de lithium.*	1 x 2,0 mL
CAL	**Calibrateurs 2-5 PSA** *Acide nucléique PSA non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.*	4 x 1,7 mL
PC	**Contrôles positifs PSA** *Acide nucléique PSA non infectieux dans une solution tamponnée de phosphate contenant <5 % sulfate de lauryle et de lithium.*	2 x 1,7 mL
	Fiche d'informations sur la concentration PSA	1 fiche

Liquides pour tests Aptima — Conserver entre 15 °C et 30 °C (2 boîtes) dès la réception et jusqu'à la date de péremption indiquée

Symbole	Composant	Quantité
W	**Solution de lavage** *Solution tamponnée HEPES contenant <2 % de dodécyl sulfate de sodium.*	1 x 402 mL
DF	**Tampon pour solution de désactivation** *Solution tamponnée de bicarbonate.*	1 x 402 mL
O	**Réactif huileux** *Huile de silicone.*	1 x 24,6 mL

Remarque : *Tout le matériel inclus dans le Progensa PCA3 Assay Kit peut aussi être acheté séparément (voir le chapitre Matériels pour de plus amples détails).*

Matériels

Remarque : *Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.*

Remarque : *Les références du matériel disponible chez Hologic sont indiquées.*

Matériel requis mais disponible séparément

	Nº de référence
Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit	302352
Luminomètre Leader HC+	104747
Système de capture de cible (Target Capture System, TCS) Hologic	104555
Kit Auto Detect Aptima	301048
2 pipeteurs à répétition eppendorf Repeater Plus	105725
Embouts de pipeteur à répétition (2,5 mL, 5,0 mL, 25,0 mL)	—
Soit :	—
2 vortexeurs (mélangeur à tourbillon multi-tubes) (référence 102160F) *3 bains-marie circulateurs (référence 104586F)* *(62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)* *3 séparateurs pour bain-marie (référence 104627)*	
OU	
2 SB100 Dry Heat Bath/vortexeurs (référence 105524F) *Des instruments SB100 supplémentaires peuvent être nécessaires selon le débit requis throughput*	
Micro-pipeteur, 1 000 µL RAININ PR1000	901715
Embouts, 1 000 µL P1000	105049
Pipeteur, eppendorf 20 à 200 µL	105726
Embouts, pipette 20 à 200 µL	—
Javel, solution d'hypochlorite de sodium dosée de 5 % à 7 % (0,7 à 1,0 M)	—
Récipient plastique à large couvercle	—
Récipients standard pour la collecte d'urine, sans conservateurs	—
Unités de dix tubes (TTU)	TU0022
Cassette de dix embouts (TTC)	104578
Solution-étalon SysCheck (vérification système)	301078

Matériel optionnel

	Nº de référence
Kit Progensa PCA3 100 réactions	302354
Kit Progensa PSA 100 réactions	302357
Kit de calibrateurs et contrôles Progensa PCA3	302353

		Nº de référence
Kit de calibrateurs et contrôles Progensa PSA		302356
Progensa PCA3/PSA Proficiency Panels		302350
Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit		302351
Kit de liquides pour tests Aptima		302002C
Embouts de pipette jetables avec filtre (1 mL)		10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4		900932
Plaque de support pour PCA3, DTS 800 *Réservoir à réactif (quart de module de 40 mL)* *Réservoir à réactif partagé en deux (quart de module de 19 mL x 2)*	*(référence 902021)* *(référence 104765)* *(référence 901172)*	—
Tubes de transport		302521
Bouchons pénétrables de rechange		302520
Bouchons non pénétrables de rechange		103036A

Avertissements et précautions

A. Pour diagnostic *in vitro*.

B. Réservé à l'exportation américaine.

Recommandations concernant les laboratoires

C. N'utilisez que le matériel de laboratoire jetable fourni ou recommandé.

D. Prenez les précautions de laboratoire habituelles. Il est interdit de manger, de boire ou de fumer dans les zones de travail signalées. Portez des gants jetables sans poudre, des lunettes de protection et des blouses de laboratoire pour manipuler les échantillons d'urine et les réactifs des kits. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons d'urine et les réactifs des kits.

E. **Avertissement : Irritants, corrosifs.** Évitez tout contact d'Auto Detect 1 et Auto Detect 2 avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact de ces liquides avec la peau ou les yeux, lavez la zone affectée à l'eau. En cas de déversement de ces liquides, diluez le produit répandu à l'eau avant de l'essuyer.

F. Les plans de travail, pipettes et autre matériel doivent être régulièrement décontaminés avec une solution d'hypochlorite de sodium (solution de javel diluée) entre 2,5 % à 3,5 % (0,35 à 0,5 M) (voir *Remarques concernant la procédure*).

G. Il est fortement recommandé de réserver un espace de travail spécifique pour la post-amplification afin de minimiser la contamination par l'amplicon lors du test. Cette zone de travail devrait être éloignée de la zone de préamplification, là où ont lieu la préparation des réactifs, la capture de cible et l'amplification.

H. Pour éviter la contamination des différentes zones du laboratoire par l'amplicon, le sens de travail du laboratoire devrait être unidirectionnel : depuis la préparation des réactifs jusqu'à la post-amplification. Les échantillons, le matériel et les réactifs ne doivent pas être ramenés là où une étape précédente a été effectuée. Le personnel ne doit pas retourner dans les zones de travail des étapes précédentes sans s'entourer de précautions adéquates pour éviter toute contamination.

Recommandations concernant les échantillons

I. Une fois l'urine versée dans le tube de transport d'échantillons d'urine, le niveau de liquide de ce tube doit se situer entre les deux lignes indicatrices noires de l'étiquette du tube. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être rejeté.

J. Observer des conditions de conservation adéquates pendant le transport des échantillons pour préserver leur intégrité. La stabilité des échantillons dans des conditions de transport autres que celles recommandées n'a pas été évaluée.

K. Les dates de péremption indiquées sur les kits de collecte se rapportent au site de collecte et non pas au lieu de réalisation du test. Les échantillons collectés avant la date de péremption du kit de collecte, puis transportés et conservés conformément à la notice du test, sont valides pour être testés même si la date de péremption du tube de collecte est dépassée.

L. Conservez tous les échantillons aux températures indiquées. La performance du test peut être affectée par l'utilisation d'échantillons mal conservés. Voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour des instructions précises.

M. Les échantillons d'urine peuvent être infectieux. Respectez les précautions universelles lors de la réalisation de ce test. Le responsable du laboratoire devra avoir établi des méthodes de manipulation et d'élimination des déchets adéquates. Seul le personnel ayant reçu une formation adéquate pour utiliser le test Progensa PCA3 et manipuler correctement des substances infectieuses doit être autorisé à effectuer cette procédure.

N. Évitez toute contamination croisée lors des étapes de manipulation des échantillons. Les échantillons d'urine peuvent contenir des taux élevés de RNA cible. Veillez à éviter tout contact entre les différents récipients d'échantillons et à ne pas passer au-dessus d'un récipient ouvert en jetant des éléments usagés. Changez de gants en cas de contact avec un échantillon pour éviter toute contamination croisée.

Recommandations concernant les tests

O. Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption.

P. **Pour le kit du test Progensa PCA3, ne jamais échanger, mélanger ou combiner des réactifs de test PCA3 ayant des numéros de lots différents** (c.-à-d. pour chaque analyte, les réactifs de test dans la boîte « réfrigérée » et la boîte à « température ambiante » doivent provenir d'un seul et même lot). Les réactifs de test peuvent être utilisés avec différents lots de kits de contrôles et de calibrateurs. Les kits de liquides des tests Aptima sont interchangeables. Il n'est pas nécessaire d'apparier les kits de réactifs PCA3 et PSA.

Q. Conservez tous les réactifs du test aux températures indiquées. Les résultats du test peuvent être affectés par l'utilisation de réactifs de test mal conservés. Voir *Conditions de conservation et de manipulation* et *Remarques concernant la procédure* pour des instructions précises.

R. Pour la désactivation du test (voir *Procédure de test*), la concentration minimum de javel doit être de 2,5 % (0,35 M) d'hypochlorite de sodium **après** une dilution de 1/1 avec un tampon de désactivation. Pour cette raison, l'eau de javel de départ doit être dosée de 5 % à 7 % (0,7 à 1,0 M) pour parvenir à la concentration finale requise pour la désactivation.

S. Des embouts de pipette munis de filtres hydrophobes doivent être utilisés. Réservez au minimum deux pipeteurs à répétition pour ce test : un premier qui sera utilisé lors des étapes de préamplification et l'autre pour celles de post-amplification. Réservez un micro-pipeteur au transfert des échantillons, sauf si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4. Tous les pipeteurs doivent être régulièrement nettoyés conformément à la section *Remarques concernant la procédure*.

T. Si vous utilisez des pipeteurs à répétition pour ajouter des réactifs, ne touchez pas le tube réactionnel avec l'embout de la pipette afin d'éviter toute contamination d'un tube à l'autre.

U. Un mélange adéquat est nécessaire pour obtenir des résultats de test précis. Pour de plus amples détails, consultez la *Remarques concernant la procédure*.

V. Réservez des bains-marie distincts aux étapes de préamplification, d'amplification et de post-amplification lors du test.

W. Certains réactifs de ce kit sont accompagnés de symboles de risque et de sécurité conformément à la directive européenne 1999/45/EC et doivent être manipulés en conséquence. Les fiches techniques de sécurité peuvent être consultées sur le site www.hologic.com et sont disponibles sur demande.

Conditions de conservation et de manipulation

A. Consultez le Tableau 1 pour toute information sur la conservation des réactifs.

Tableau 1 : Conservation des réactifs

Réactif/liquide	Conservation avant ouverture	Stabilité à l'état ouvert/reconstitué (jusqu'à la date de péremption)
Réactifs d'amplification	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 2 °C et 8 °C*
Réactifs de sonde	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 2 °C et 8 °C*
Enzyme Reagent	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 2 °C et 8 °C*
Réactifs Target Capture	15 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Amplification Reconstitution Solution	2 °C à 30 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (usage unique)
Probe Reconstitution Solution	2 °C à 30°C jusqu'à la date de péremption	S.O. (usage unique)
Enzyme Reconstitution Solution	2 °C à 30°C jusqu'à la date de péremption	S.O. (usage unique)
Réactif de sélection	2 °C à 30°C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Calibrateurs	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (une seule série)
Contrôles	2 °C à 8 °C jusqu'à la date de péremption	S.O. (une seule série)
Réactif huileux	15 °C à 30°C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Solution de lavage	15 °C à 30°C jusqu'à la date de péremption	30 jours entre 15 °C et 30 °C
Tampon pour solution de désactivation	15 °C à 30°C jusqu'à la date de péremption	28 jours entre 15°C et 30°C

* Peut être réutilisé jusqu'à quatre fois pour d'autres séries de test dans la mesure où le temps total à température ambiante ne dépasse pas 24 heures.

B. Ne pas conserver le réactif Target Capture à des températures inférieures à 15 °C.

C. Le réactif-sonde et le réactif-sonde reconstitué sont photosensibles. Evitez toute exposition prolongée de ces réactifs à la lumière pendant leur conservation et leur préparation.

D. Ne pas congeler les réactifs.

E. Ne pas utiliser les réactifs ou liquides après la date de péremption.

F. Les calibrateurs et contrôles Progensa PCA3 et PSA sont des flacons prévus pour une seule série et doivent être jetés après utilisation.

G. Des modifications dans l'aspect physique du réactif fourni peuvent être un signe d'instabilité ou de détérioration. Si l'aspect physique des réactifs remis en suspension présente toujours des altérations (par ex., changements évidents dans la couleur du réactif ou turbidité indicative d'une contamination microbienne), contactez le Service technique de Hologic avant toute utilisation.

H. Jetez le réactif reconstitué après 30 jours ou à la date de péremption indiquée si celle-ci survient avant.

I. Le surplus des réactifs ouverts ou reconstitués peut être utilisé lors de tests ultérieurs s'ils sont conservés de manière appropriée après leur utilisation initiale. Le surplus de réactif peut être ajouté à un réactif fraîchement préparé ou au surplus d'un réactif du même lot. **Ne pas échanger, mélanger ou combiner les réactifs de kits portant différents numéros de lots** (voir *Avertissements et précautions*). Aucun des composants du réactif groupé ne peut dépasser les limites de conservation du réactif ouvert ou reconstitué. Vérifiez que le réactif groupé a été soigneusement mélangé et qu'il a été préparé en quantité suffisante pour toute la série de tests.

Collecte, transport et conservation des échantillons

Le test Progensa PCA3 est conçu pour quantifier le RNA du PCA3 et du PSA dans l'urine de premier jet recueillie après un toucher rectal consistant en trois effleurages par lobe. L'urine est traitée à l'aide du Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit. La stabilité du RNA du PCA3 et du PSA dans l'urine ainsi que l'urine traitée a été établie en surveillant les taux de copie de RNA dans les échantillons d'urine collectés conformément aux instructions ci-dessous.

A. Instructions concernant la collecte et le traitement des échantillons d'urine :

1. Il peut être utile de demander au patient de consommer une quantité d'eau importante (environ 500 mL) pour obtenir un volume d'urine suffisant à collecter.
2. Effectuez le toucher rectal comme indiqué ci-dessous immédiatement avant la collecte d'urine :

   Exercez une pression suffisante sur la prostate pour enfoncer sa surface d'environ 1 cm, de la base à l'apex prostatique et de la ligne latérale à la ligne médiane pour chaque lobe, comme illustré en Figure 1. Effectuez exactement trois effleurages par lobe. Cette technique n'est pas destinée à être un massage prostatique.

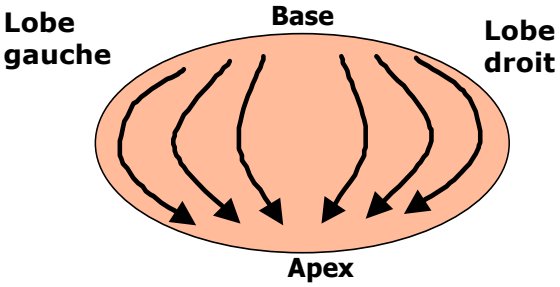

Figure 1. Direction correcte de la pression exercée sur la prostate

3. Après le toucher rectal, demandez au patient de collecter l'urine de premier jet (environ 20 à 30 mL du jet d'urine initial) dans un récipient de collecte d'urine correctement étiqueté. Il doit s'agir du premier échantillon d'urine éliminée après le toucher rectal. Utilisez un récipient de collecte ne contenant aucun conservateur. Si le patient ne parvient pas à arrêter son flux d'urine et qu'il fournit plus que les 20 à 30 mL requis, conservez la totalité de ce volume. Si le patient est dans l'incapacité de fournir le volume d'urine requis, 2,5 mL au moins seront nécessaires pour effectuer le test Progensa PCA3. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être rejeté.

   Remarque : *Des volumes d'urine très élevés peuvent baisser les concentrations d'analytes PCA3 et PSA, et peuvent moins fréquemment produire des échantillons non valides. Le patient doit donc éviter de remplir le récipient de collecte.*

4. **Les échantillons d'urine non traités doivent, s'ils ne sont pas traités sur-le-champ, être conservés entre 2 °C et 8 °C ou sur de la glace. L'échantillon d'urine refroidi et non traité doit être transféré dans le tube de transport d'échantillons d'urine dans les 4 heures qui suivent sa collecte. Sinon, l'échantillon doit être refusé et un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient. Ne pas congeler les échantillons d'urine non traités.**

5. Pour traiter les échantillons d'urine, rebouchez fermement l'échantillon et retournez-le 5 fois pour remettre les cellules en suspension. Retirez le bouchon du tube de transport d'échantillons d'urine et transférez 2,5 mL de l'urine collectée dans le tube au moyen de la pipette de transfert jetable fournie à cet effet. Le volume d'urine ajouté est adéquat lorsque le niveau de liquide se situe entre les lignes indicatrices noires situées sur l'étiquette du tube de transport d'échantillons d'urine.
6. Rebouchez le tube de transport de l'échantillon d'urine fermement et retournez l'échantillon d'urine 5 fois pour le mélanger. Il y sera fait maintenant référence sous le nom d'échantillon d'urine traité.

B. Transport et conservation des échantillons avant le test:

1. Les échantillons d'urine traités doivent être transportés au laboratoire dans le tube de transport d'échantillons d'urine. Ils peuvent être expédiés à température ambiante (sans contrôle de température) ou bien congelés. Prenez les dispositions nécessaires concernant l'expédition des échantillons pour s'assurer qu'ils sont réceptionnés par le site de test dans les 5 jours suivant leur collecte.

   Une fois l'échantillon reçu, le laboratoire doit vérifier la date de collecte de l'échantillon sur le tube. Si les échantillons ont été expédiés à température ambiante et qu'ils sont reçus plus de 5 jours après la collecte, l'échantillon doit être refusé et un nouvel échantillon doit être demandé. Le laboratoire peut conserver les échantillons entre 2 °C et 8 °C pendant 14 jours maximum avant qu'il ne faille les jeter. Si des périodes plus longues sont nécessaires, se référer au Tableau 2 pour les durées de conservation autorisées à différentes températures.

   Tableau 2 : Durées de conservation des échantillons d'urine traités

Température de conservation	**Durée**
Conservation et expédition des échantillons traités :	jusqu'à 5 jours*
Après réception par le site conduisant les tests :	
2 °C à 8 °C	jusqu'à 14 jours
-35 °C à -15 °C	jusqu'à 11 mois**
À -65 °C ou en dessous	jusqu'à 36 mois**

*Durée autorisée pour un envoi à température ambiante ou congelé.

** Durée autorisée après conservation sous congélation.

2. Les échantillons d'urine traités peuvent subir un total de 5 cycles de congélation-décongélation.

C. Conservation des échantillons après les tests:

1. Les échantillons qui ont été testés doivent être rangés dans un portoir en position verticale.
2. Les tubes de transport d'échantillons d'urine doivent, s'ils ne sont pas rebouchés avec un bouchon intact, être recouverts d'une nouvelle barrière de plastique ou d'aluminium propre.
3. Si certains des échantillons testés doivent être congelés ou envoyés, retirez les bouchons pénétrables et placez de nouveaux bouchons non pénétrables sur les tubes de transport d'échantillon d'urine. Si les échantillons doivent être envoyés pour être testés dans un autre établissement, les températures recommandées doivent être maintenues. **Évitez les projections et la contamination croisée.**

Remarque : *Le transport des échantillons doit s'effectuer conformément aux réglementations nationale et internationale applicables relatives au transport.*

Procédure de test

A. Préparation de la zone de travail

1. Préparez un premier bain-marie à 62 °C ± 1 °C pour la préamplification, un second bain-marie à 42 °C ± 1 °C pour l'amplification et un troisième bain-marie à 62 °C ± 1 °C pour la post-amplification. Assurez-vous que ces bains-marie contiennent une quantité d'eau suffisante (voir *Remarques concernant la procédure*). Si l'on utilise le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, se référer à la fiche d'application du *SB100 Dry Heat Bath/vortexeur pour le test* Progensa *PCA3* (*Fiche d'application du SB100*).
2. Avant d'entreprendre le test, essuyez les plans de travail et les pipeteurs avec une solution d'hypochlorite de sodium dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 à 0,5 M). Laissez la solution d'hypochlorite de sodium au contact des surfaces et des pipeteurs pendant au moins 1 minute, puis rincez à l'eau. Ne laissez pas sécher la solution d'hypochlorite de sodium. Couvrez la surface de la paillasse sur laquelle le test sera effectué avec des protections de laboratoire absorbantes propres avec envers plastifié.
3. Placez un nombre suffisant de cassettes de dix embouts dans le système de capture de cible (Target Capture System, TCS). Vérifiez que la bouteille de solution de lavage TCS est remplie avec la solution de lavage et que l'aspirateur est branché sur la pompe à vide. (Se référer au *Manuel de l'opérateur du Système Target Capture*.)

B. Reconstitution et préparation des réactifs

La reconstitution des réactifs doit être effectuée avant d'entreprendre le transfert des échantillons.

1. Afin de reconstituer le réactif d'amplification, le réactif enzymatique et le réactif-sonde, combinez les flacons de réactif lyophilisé à la solution de reconstitution. Si elles ont été réfrigérées, laissez les solutions de reconstitution parvenir à température ambiante avant l'emploi.

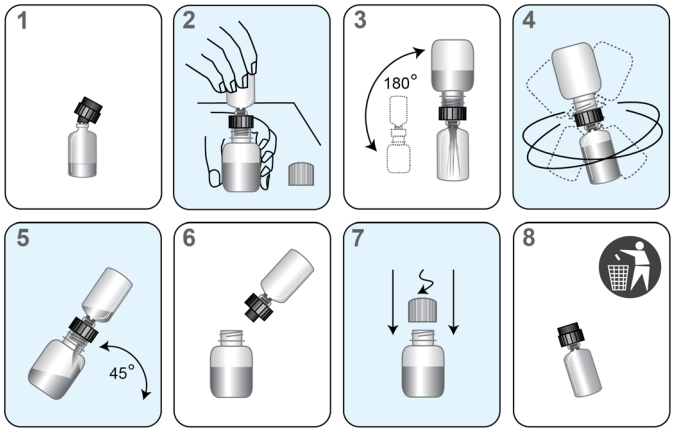

Figure 2. Processus de reconstitution

a. Appariez la solution de reconstitution appropriée avec le réactif déshydraté. Vérifiez que les flacons ont les mêmes couleurs d'étiquette pour s'assurer qu'ils sont correctement appariés.

b. Ouvrez le flacon de réactif déshydraté et insérez fermement l'extrémité portant une encoche du collet de reconstitution dans l'ouverture du flacon (Figure 2, étape 1).
c. Ouvrez la solution de reconstitution correspondante et posez le bouchon sur une surface de travail propre et couverte. Tout en tenant le flacon de solution sur la paillasse, insérez fermement l'autre extrémité du collet de reconstitution dans l'ouverture du flacon (Figure 2, étape 2).
d. Retournez délicatement l'assemblage de flacons. Laissez la solution s'écouler depuis le flacon dans le flacon en verre (Figure 2, étape 3). Attendez que le réactif lyophilisé se mêle à la solution, puis faites tourner délicatement la solution dans le flacon en verre en lui imprimant un mouvement circulaire pour la mélanger. Évitez de faire de la mousse lorsque vous tournez le flacon (Figure 2, étape 4).
e. Inversez l'assemblage puis inclinez-le à un angle de 45° pour minimiser la formation de mousse (Figure 2, étape 5). Laissez la totalité du liquide retourner dans le flacon en plastique.
f. Retirez le collet de reconstitution et le flacon en verre (Figure 2, étape 6).
g. Rebouchez le flacon en plastique (Figure 2, étape 7). Indiquez les initiales de l'opérateur et la date de reconstitution sur tous les flacons de réactif reconstitué. N'oubliez pas d'indiquer l'analyte (PCA3 ou PSA) sur les flacons de réactif de sonde.
h. Jetez le collet de reconstitution et le flacon en verre (Figure 2, étape 8).

2. Les réactifs de sonde, d'amplification et enzymatiques précédemment reconstitués doivent parvenir à température ambiante (15 °C à 30 °C) avant d'entreprendre le test. Consultez *Conditions de conservation et de manipulation* pour grouper des surplus de réactifs. Si le réactif d'amplification reconstitué contient un précipité qui empêche la solution de revenir à température ambiante, chauffez-le à 62 °C ± 1 °C pendant 1 à 2 minutes dans la zone de préamplification. Si le réactif de sonde reconstitué contient un précipité qui empêche la solution de revenir à température ambiante, chauffez-le à 62 °C ± 1 °C pendant 1 à 2 minutes dans la zone de post-amplification. Après ces étapes, les réactifs de sonde reconstitués peuvent être utilisés, même s'il reste des précipités résiduels. Après la remise en suspension, mélangez les flacons délicatement par retournement.

C. Installation des portoirs

Le pipeteur à répétition utilisé pour la capture de cible, le transfert d'échantillons et l'amplification doit être réservé à ces étapes uniquement (voir *Avertissements et précautions*).

1. Installez un portoir pour l'analyte PCA3 et un autre pour l'analyte PSA.

   Remarque : *Si le nombre d'échantillons est relativement peu important, il est possible de tester les deux analytes sur un seul portoir. Si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, il est nécessaire d'avoir des portoirs distincts pour chaque analyte. Il n'est pas possible de tester plus de deux portoirs complets (20 TTU) à la fois.*

2. Dans le ou les portoirs pour unités de dix tubes (TTU), placez un nombre suffisant d'unités TTU pour les calibrateurs, les contrôles et échantillons de chaque analyte.
3. Inscrivez les ID d'échantillon sur les unités TTU. Tableau 3 Le décrit l'ajout de calibrateurs, contrôles et échantillons. Chargez les calibrateurs PSA sur une nouvelle unité TTU.

Remarque : *Les calibrateurs doivent être analysés en trois réplicats et les contrôles en deux réplicats chacun, et ce sur le même portoir que les échantillons. Les échantillons doivent être analysés en double. Ne pas laisser de tubes vides entre les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Si l'on utilise l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, se référer à la Fiche d'application du TECAN Freedom EVO 100/4 pour le test Progensa PCA3 (Fiche d'application du TECAN Freedom EVO) pour de plus amples instructions.*

Tableau 3 : Préparation du portoir - exemple

Position de portoir	Description de l'échantillon	*Concentration cible du PCA3 (Copies/mL)	*Concentration cible du PSA (Copies/mL)
1 à 3	Calibrateur 1	0	0
4 à 6	Calibrateur 2	250	7 500
7 à 9	Calibrateur 3	2 500	75 000
10 à 12	Calibrateur 4	25 000	750 000
13 à 15	Calibrateur 5	125 000	3 000 000
16 à 17	Contrôle A	1 250	37 500
18 à 19	Contrôle B	62 500	1 500 000
20 à n	Échantillon	inconnu	inconnu

*Les calibrateurs et contrôles positifs PCA3 et PSA ont des valeurs assignées, et les valeurs c/mL effectives des calibrateurs 2 à 5 et des contrôles A et B seront légèrement différentes des concentrations cible figurant dans le tableau et varieront d'un lot à l'autre. Les valeurs assignées seront indiquées sur une fiche incluse dans le conditionnement des flacons de calibrateurs et de contrôles et serviront à la calibration et la détermination de la validité de la série.

D. Vérification des informations relatives à la concentration

Vérifiez avec l'administrateur système du logiciel de test Progensa PCA3 que les informations de concentration des lots des kits de calibrateurs et de contrôle Progensa PCA3 et PSA testés ont été saisies. Pour de plus amples informations, consultez le *Guide de référence rapide pour le test Progensa PCA3* (*Manuel de référence rapide*) ou le *Manuel de l'administrateur système du logiciel de test Progensa PCA3*.

Remarque : *La saisie des données de concentration est indispensable* ***avant la première utilisation*** *de chaque nouveau lot de kit de calibrateurs et de contrôles. Les séries ultérieures utilisant les calibrateurs et contrôles du même lot de kit ne nécessitent aucune vérification supplémentaire.*

E. Configuration du Worklist Editor

Générez une liste de travail pour la série de tests au moyen du Worklist Editor Hologic sur un ordinateur situé dans la zone de préamplification. Concernant l'utilisation du Worklist Editor, consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'opérateur du Worklist Editor* Hologic. Si l'on utilise l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, se référer également à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO* pour un complément d'information.

F. Préparation des échantillons

1. Laissez les calibrateurs et les contrôles parvenir à température ambiante avant le test. Mélangez les flacons délicatement par retournement.
2. Laissez les échantillons parvenir à température ambiante avant le test. **Ne pas vortexer les échantillons.** Les échantillons doivent être mélangés délicatement et occasionnellement par inversion pendant la période de réchauffement. Voir les

Remarques concernant la procédure pour de plus amples informations sur les précipités qui ne se mettent pas en solution et la manipulation des échantillons congelés.

G. Préamplification

La préamplification doit s'effectuer dans un environnement dont la température est située entre 15 °C et 30 °C et sur deux portoirs en parallèle. Run both racks in parallel. Si vous utilisez le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, référez-vous à la *Fiche d'application du SB100.* Si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, référez-vous à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO* pour un complément d'information.

1. Mélangez soigneusement en tournant ou en inversant le réactif Target Capture (TCR). A l'aide d'un pipeteur à répétition, ajoutez 100 µL du TCR spécifique à l'analyte dans le tube réactionnel correspondant.
2. Percez le bouchon du flacon du calibrateur à l'aide du micro-pipeteur et ajoutez 400 µL du calibrateur dans le tube réactionnel correctement étiqueté. Utilisez le même embout de pipette pour retirer les ajouts de réplicats du flacon à travers le bouchon percé. Utilisez de nouveaux embouts de pipette avec chaque flacon de calibrateur. Recommencez pour l'ajout des contrôles et échantillons. Couvrez et conservez le surplus d'échantillon à une température de 8 °C ou inférieure (voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples informations) au cas où il serait nécessaire de reprendre le test.
3. Couvrez les unités TTU avec des cartes de protection et agitez délicatement le portoir manuellement. **Ne pas vortexer.** Incubez le portoir dans un bain-marie à 62 °C ± 1 °C pendant 30 ± 5 minutes.
4. Retirez le portoir du bain-marie et séchez le fond des tubes sur un matériau absorbant.
5. Vérifiez que les cartes de protection sont fermement positionnées. Au besoin, remplacez-les par de nouvelles cartes de protection et fermez hermétiquement les unités TTU.
6. Vortexez le portoir pendant 60 secondes sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes) (voir *Remarques concernant la procédure*). Le portoir doit être vortexé dans les 2 minutes qui suivent son retrait du bain-marie.
7. Sans retirer les cartes de protection, incubez le portoir à température ambiante pendant 30 ± 5 minutes.
8. Placez le portoir, avec l'onglet Front devant, sur la base magnétique TCS pendant 5 à 10 minutes. Chargez le portoir pour unités TTC avec les unités TTC.
9. Amorcez les conduites de la pompe du poste de distribution en pompant la solution de lavage dans la rampe de distribution. Pompez une quantité suffisante de liquide dans le système afin d'éviter toute formation de bulle d'air dans les tubulures et de dispenser un flux régulier de liquide par les dix têtes.
10. Mettez la pompe à vide en marche et débranchez la rampe d'aspiration du premier connecteur situé entre la rampe d'aspiration et le flacon piège. Assurez-vous que la jauge de vide satisfait les spécifications du test de fuite. Il est possible que 15 secondes soient nécessaires pour obtenir une lecture. Rebranchez la rampe et vérifiez que la jauge de dépression est bien conforme à la spécification du niveau de dépression. Laissez la pompe à vide en marche jusqu'à ce que toutes les étapes de la capture de cible soient terminées et que la tubulure de la rampe d'aspiration soit sèche.

Consultez la Fiche des spécifications de dépression du Système Target Capture située au verso du *Manuel de l'opérateur du Système Target Capture* ou contactez le Service technique de Hologic pour de plus amples renseignements.

11. Fixez fermement la rampe d'aspiration au premier jeu d'embouts. Abaisser les embouts dans la première TTU jusqu'à ce que les embouts soient au contact de la surface du liquide. Maintenir le contact entre les embouts et le liquide lors de la baisse du niveau du liquide jusqu'à ce qu'ils touchent brièvement le fond des tubes. Tapoter délicatement les embouts sur les fonds des tubes jusqu'à ce que tout le liquide restant ait été aspiré. Ne pas maintenir longtemps les embouts contre le fond des tubes ou tapoter les embouts de manière rapide car cela peut entraîner la formation de mousse dans le piège à vide.
12. Une fois l'aspiration terminée, éjectez les embouts dans leur cassette d'origine. Recommencez les étapes d'aspiration pour les unités TTU restantes en réservant un embout pour chaque tube réactionnel.
13. Placez la rampe de distribution sur chaque unité TTU et, à l'aide de la pompe du poste de distribution, versez 1,0 mL de solution de lavage dans chacun des tubes de l'unité TTU.
14. Couvrez les tubes avec une carte de protection et retirez le portoir du TCS. Vortexez le portoir une fois sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes). Consultez la section *Remarques concernant la procédure* pour de plus amples informations.
15. Placez le portoir sur la base magnétique du TCS pendant 5 à 10 minutes.
16. Aspirez la totalité du liquide comme dans les Étapes 11 et 12.
17. Après l'aspiration finale, retirez le portoir du socle TCS et inspectez visuellement les tubes pour vérifier que le liquide a été totalement aspiré et que tous les tubes contiennent des billes de particules magnétiques. S'il reste visiblement du liquide, remettez le portoir sur la base TCS pendant 2 minutes et refaites l'aspiration pour cette unité TTU en prenant les mêmes embouts que ceux utilisés précédemment pour chaque tube réactionnel. Si la MOINDRE bille de particule magnétique est visible une fois l'aspiration terminée, le tube peut être accepté. Si aucune bille n'est visible, l'échantillon doit être testé à nouveau. Si le même échantillon ne contient pas de bille de particule magnétique dans cette étape et lors d'une série ultérieure, ceci peut indiquer un problème lié à l'échantillon. Il est alors recommandé d'effectuer une nouvelle collecte de l'échantillon d'urine.

H. Amplification

Remarque : *L'ajout d'un enzyme dans un portoir à réaction (Étapes 6 et 7 ci-dessous) doit être effectué en moins de 90 secondes.*

Effectuez les Étapes 6 et 7 sur le premier portoir, puis recommencez sur le second portoir. Si vous utilisez le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, référez-vous à la *Fiche d'application du SB100*. Si vous utilisez l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, référez-vous à la *Fiche d'application du TECAN Freedom EVO* pour un complément d'information.

1. A l'aide d'un pipeteur à répétition, ajoutez 75 µL du réactif d'amplification reconstitué spécifique à l'analyte dans chaque tube réactionnel. Tous les mélanges réactionnels du portoir doivent maintenant être rouges.
2. À l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 200 µL de réactif huileux.
3. Couvrez les tubes avec une carte de protection et vortexez-les sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes).

4. Incubez le portoir dans un bain-marie de préamplification à 62 °C ± 1 °C pendant 10 ± 5 minutes.
5. Transférez le portoir dans un bain-marie à 42 °C ± 1 °C pendant 5 ± 2 minutes.
6. Une fois le portoir dans le bain-marie, retirez soigneusement la carte de protection et, à l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 25 µL du réactif enzymatique reconstitué à chacun des mélanges réactionnels. Toutes les réactions doivent maintenant avoir une teinte orangée.
7. Couvrez immédiatement les tubes avec une nouvelle carte de protection, retirez le portoir du bain-marie et mélangez rapidement les réactions en agitant délicatement le portoir manuellement.

   Remarque : *Minimisez le temps pendant lequel le portoir est hors du bain-marie pour éviter le refroidissement des tubes.*
8. Incubez le portoir à 42 °C ± 1 °C pendant 60 ± 5 minutes.

I. Post-amplification

Le pipeteur à répétition utilisé pour l'hybridation et la sélection doit être réservé uniquement à ces étapes (voir *Avertissements et précautions*). L'environnement de la post-amplification, y compris la détection, doit être à une température de 15 °C à 30 °C. Si vous utilisez le SB100 Dry Heat Bath/vortexeur, référez-vous à la *Fiche d'application du SB100.*

1. Hybridation
   a. Retirez le portoir du bain-marie de préamplification et transférez-le dans la zone de post-amplification. A l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 100 µL de réactif de sonde reconstitué spécifique à l'analyte. Tous les mélanges réactionnels doivent maintenant avoir une teinte jaune.
   b. Couvrez les tubes avec une carte de protection et vortexez-les pendant 10 secondes, ou jusqu'à l'obtention d'une teinte uniforme, sur le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes).
   c. Incubez le portoir dans un bain-marie à 62 °C ± 1 °C pendant 20 ± 5 minutes.
   d. Retirez le portoir du bain-marie et laissez incuber à température ambiante pendant 5 ± 1 minutes.
2. Sélection
   a. A l'aide du pipeteur à répétition, ajoutez 250 µL de réactif de sélection dans chaque tube. Toutes les réactions doivent maintenant avoir une teinte rose.
   b. Couvrez les tubes avec une carte de protection, vortexez pendant 10 secondes ou jusqu'à l'obtention d'une teinte uniforme, et incubez le portoir dans un bain-marie à 62 °C ± 1 °C pendant 10 ± 1 minutes.
   c. Retirez le portoir du bain-marie. Incubez le portoir à température ambiante pendant 15 ± 3 minutes.

J. Détection

Concernant l'utilisation du Leader HC+ Luminometer, consultez le *Manuel de l'utilisateur du Leader HC+ Luminometer*. Pour utiliser le logiciel de test du Progensa PCA3, consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'administrateur système du logiciel de test du Progensa PCA3 ainsi que le Manuel de l'opérateur*.

1. Préparez le Leader HC+ Luminometer en plaçant une unité TTU vide dans la position de cassette numéro 1 et effectuez le protocole de LAVAGE une fois.

2. Vérifiez que les volumes d'Auto Detect 1 et 2 sont suffisants pour effectuer les réactions.
3. Chargez les unités TTU dans le luminomètre en vous guidant pour cela sur le diagramme du luminomètre. Si les deux analytes sont testés (séries consécutives), chargez tout d'abord les unités TTU de PCA3 suivies immédiatement des unités TTU de PSA.
4. Connectez-vous à l'ordinateur. Cliquez sur **NEW RUN** (NOUVELLE SERIE) et sélectionnez le protocole de test et les concentrations adéquates. Cliquez sur **NEXT** (SUIVANT) pour commencer la série.

   Remarque : *La série doit être complétée dans les 2 heures qui suivent la fin de l'incubation à 62 °C de l'étape de sélection.*
5. Préparez une solution de désactivation en mélangeant un volume identique d'hypochlorite de sodium de 5 % à 7 % (0,7 M à 1,0 M) et de tampon pour solution de désactivation dans un récipient en plastique équipé d'un grand couvercle. Mettez une étiquette et inscrivez la date de péremption sur le récipient en plastique. La solution de désactivation est stable 4 semaines à température ambiante.
6. Une fois la série terminée, le logiciel de test génère deux rapports sur la série, un Rapport sur la série brute et un Rapport sur les ratios dans le cas de séries consécutives (voir *Procédures de contrôle de qualité* and *Interprétation des résultats*).
7. Une fois la série terminée, retirez les unités TTU utilisées du luminomètre et placez-les dans le récipient contenant la solution de désactivation. Laissez les unités TTU dans le récipient pendant au moins 15 minutes avant de les jeter. Le responsable du laboratoire devra avoir établi des méthodes de manipulation et d'élimination des déchets adéquates.

Remarques concernant la procédure

A. Préparation des échantillons

1. Si l'échantillon contient des précipités en suspension, chauffez-le à 37 °C pendant 5 minutes maximum avant de le mélanger par retournements délicats. Si le précipité ne se remet pas en solution, vérifiez que ce précipité n'interfère pas avec le prélèvement d'échantillons.
2. Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante (de 15 °C à 30 °C, avec utilisation éventuelle d'un bain-marie) avec des retournements occasionnels pendant le processus de décongélation pour éviter la formation d'un bouchon insoluble. Mélangez les flacons par retournements délicats une fois que la glace contenue à l'intérieur est suffisamment décongelée pour se détacher et bouger librement. Continuez à réchauffer jusqu'à décongélation complète des échantillons. Mélangez ensuite les flacons par retournements délicats.
   a. Si un bouchon se forme alors que les échantillons doivent être pipetés à l'aide de l'appareil TECAN Freedom EVO 100/4, recongelez les échantillons, puis recommencez la procédure de décongélation en veillant à éviter toute formation de bouchon. S'il s'avère impossible d'éliminer le bouchon, l'échantillon sera alors pipeté manuellement.
   b. Si un bouchon s'est formé et que les échantillons doivent être pipetés manuellement à l'aide d'un micro-pipeteur, aucune autre intervention n'est nécessaire. Vous devez cependant veiller à ce que le bouchon n'interfère pas avec le prélèvement d'échantillons.

B. Pipetage des contrôles, des calibrateurs et des échantillons

1. Le volume de calibrateur, contrôle ou échantillon ajouté à l'unité TTU doit être de 400 µL. L'inspection visuelle du volume pipeté dans l'unité TTU est recommandée pour vérifier que le transfert de volume est adéquat. Un volume adéquat est nécessaire pour obtenir des résultats précis.
2. Vérifiez que l'embout de la pipette est bien en place sur le pipeteur et que le réglage du volume est correct. Il est recommandé de vérifier visuellement le réglage du volume à la fin de chaque unité TTU (tous les 10 tubes). Relâchez lentement le piston de la pipette à un rythme constant pour le prélèvement de l'échantillon afin d'éviter toute production de mousse ou de bulles.

C. Réactifs

1. La solution de reconstitution de sonde peut se précipiter pendant la conservation. Chauffez la solution à 62 °C ± 1 °C pendant 1 à 2 minutes. Après cette étape, la solution de reconstitution de sonde peut être utilisée, même s'il reste des précipités de résidus. Après la remise en suspension, mélangez le flacon délicatement par retournement.
2. Pour pipeter des réactifs autre que le réactif enzymatique, visez légèrement le fond de la paroi du tube réactionnel (à l'endroit où le fond se courbe pour rejoindre les parois). Pour pipeter le réactif enzymatique, visez directement le centre de chaque tube réactionnel. Confirmez visuellement que les réactifs sont correctement versés (sans quantité excessive de réactif sur les parois des tubes et avec le changement de couleur adéquat).

D. Température

1. Les étapes de capture de cible, d'amplification, d'hybridation et de sélection dépendent de la température. Il est donc essentiel que les bains-marie soient maintenus dans les plages de températures indiquées.
2. La température ambiante est définie comme se situant entre 15 °C et 30 °C.

E. Durée

Les réactions de capture de cible, d'amplification, d'hybridation et de sélection sont toutes fonction du temps écoulé. Respectez les durées indiquées dans la *Procédure de test*.

F. Agitation au vortex

La qualité de l'agitation au vortex est essentielle pour assurer la bonne performance du test Progensa PCA3. Pour vortexer des réactions, réglez la vitesse du vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes) sur le réglage le plus bas, fixez solidement le portoir en place et mettez en marche. Augmentez lentement la vitesse jusqu'à ce que le liquide atteigne la moitié supérieure du tube. Vortexez pendant 10 secondes, la durée recommandée, ou jusqu'à l'obtention d'une teinte uniforme. Ensuite, tournez la vitesse sur le réglage le plus bas avant d'éteindre le vortexeur (mélangeur à tourbillon multi-tubes) et de retirer le portoir. Les mélanges réactionnels ne doivent jamais toucher les cartes de protection.

G. Bains-marie

1. Le niveau d'eau des bains-marie doit avoir une profondeur de 3,8 cm à 5,0 cm (1,5 à 2,0 pouces) depuis le plateau de support métallique (fond du bain-marie) à la surface de l'eau. Cette précaution permettra d'assurer un transfert de chaleur adéquat.

2. Pour éviter une contamination croisée, les bains-marie doivent être réservés à une étape spécifique du test.

H. Décontamination

1. Surfaces et pipeteurs

   Les surfaces des paillasses et les pipeteurs du laboratoire doivent être décontaminées régulièrement avec une solution d'hypochlorite de sodium de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M). Laissez la solution d'hypochlorite de sodium au contact des surfaces pendant au moins 1 minute, puis rincez à l'eau. **Ne laissez pas sécher la solution d'hypochlorite de sodium.** Les solutions à base de chlore peuvent piquer le métal et le matériel. Rincez soigneusement le matériel avec de l'eau pour éviter toute piqûre de corrosion.

2. Rampe d'aspiration TC

   Après chaque utilisation :

   a. Déplacez la rampe de distribution de façon à ce qu'elle ne gêne pas.
   b. Placez une nouvelle TTC dans le portoir TTC. Mettez la pompe à vide en marche. Fixez la rampe d'aspiration aux embouts de la TTC. Aspirez tout résidu éventuel de solution de lavage dans la cuve d'amorçage du poste de distribution.
   c. Versez au moins 100 mL de solution d'hypochlorite de sodium dosée de 0,5 % à 0,7 % (0,07 M à 0,1 M), ou si vous le préférez, dosée de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M) dans la cuve d'amorçage. Aspirez la totalité de la solution au moyen de la rampe d'aspiration.
   d. Versez au moins 100 mL d'eau désionisée dans la cuve d'amorçage. Aspirez la totalité de l'eau au moyen de la rampe d'aspiration.
   e. Ejectez les embouts dans leur TTC d'origine.
   f. Laissez fonctionner la pompe à vide jusqu'à ce que la tubulure de la rampe soit sèche pour éviter tout refoulement (environ 3 minutes).
   g. Décontaminez les surfaces de la rampe d'aspiration comme expliqué sous *Unité TCS*.

3. Récipient à déchets TCS

   Nettoyez le flacon à déchets au moins une fois par semaine ou avant qu'il ne soit rempli à 25 % si cela se produit avant.

   a. Eteignez la pompe à vide et laissez la pression s'équilibrer.
   b. Débranchez les raccords à déconnexion rapide entre le flacon à déchets et le flacon de trop-plein, ainsi que le flacon à déchets et la rampe d'aspiration.
   c. Retirez le flacon à déchets du boîtier de piège à vide.
   d. Retirez le bouchon et ajoutez avec précaution 400 mL de solution d'hypochlorite de sodium dosée de 5 % à 7 % (0,7 M à 1,0 M) dans le flacon à déchets de 4 L.

      Remarque : *Cette manipulation peut être effectuée sous une hotte pour éviter les émanations dans le laboratoire.*

   e. Rebouchez le flacon à déchets et faites tourner délicatement le contenu jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
   f. Laissez le flacon à déchets reposer pendant 15 minutes minimum puis jetez le contenu (déchets).
   g. Rincez le flacon à déchets à l'eau pour éliminer tout résidu éventuel à l'intérieur.

h. Rebouchez le flacon à déchets vide et mettez-le dans le boîtier du piège à vide. Fixez le raccord à déconnexion rapide sur l'unité TCS. Jetez avec précaution les deux gants.

4. Unité TCS

   Essuyez les surfaces de l'unité TCS, la rampe d'aspiration et des embouts d'éjection du tampon de lavage avec des serviettes en papier humidifiées de solution d'hypochlorite de sodium de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M). Faites suivre cette étape par un rinçage à l'eau, puis séchez complètement les surfaces avec des serviettes en papier.

5. Portoirs

   Plongez les portoirs pour TTU dans une solution d'hypochlorite de sodium de 2,5 % à 3,5 % (0,35 M à 0,5 M) en veillant à ce qu'ils soient recouverts par la solution. Maintenez les portoirs immergés pendant 10 minutes. Toute exposition plus longue endommagerait les portoirs. Rincez soigneusement les portoirs avec de l'eau, puis séchez-les entièrement avec des serviettes en papier.

I. Contamination des tests

1. L'introduction de substances contaminantes peut se produire si la procédure du test n'est pas rigoureusement respectée.
2. Les unités TTU doivent être décontaminées dans de la solution de désactivation, conformément à la description de la *Procédure de test*. Ne réutilisez pas les TTU.
3. Effectuez une décontamination régulière du matériel et des plans de travail comme indiqué ci-dessus sous *Décontamination*.
4. Comme avec tout système de réactif, l'excès de poudre sur certains gants peut entraîner la contamination des tubes ouverts. Il est recommandé que les opérateurs utilisent des gants sans poudre.

Procédures de contrôle de qualité

A. Validité de la série

1. Les calibrateurs et les contrôles doivent être soumis à tous les tests et sur le même portoir que les échantillons testés. Les critères suivants doivent être réunis pour qu'une série soit considérée valide :

   Moyenne de RLU du Calibrateur 2 > Seuil RLU

   Où le Seuil RLU = Moyenne de RLU du Calibrateur 1
   Ecarts-types de + 1,645 pour les réplicats de RLU du Calibrateur 1
   Ecarts-types de + 1,645 pour les réplicats de RLU du Calibrateur 2.

   Récupération de la moyenne interpolée du Calibrateur 5 = 100 ± 30 %

   Récupération de la moyenne interpolée du Contrôle A = 100 ± 60 %

   Récupération de la moyenne interpolée du Contrôle B = 100 ± 35 %

2. Le logiciel PCA3 évalue automatiquement les résultats en fonction des critères ci-dessus et indique que la série a réussi **PASS** (REUSSITE) si les critères de validité sont réunis, ou qu'elle a échoué **FAIL** (ECHEC) si les critères de validité ne sont pas réunis.
3. Si l'Etat de la série indique **FAIL** (ECHEC), tous les résultats des tests d'une même série sont non valides pour cet analyte et ne doivent pas être validés.
4. Si une série n'est pas valide, elle doit être répétée pour l'analyte en question (voir *Interprétation des résultats*). Si la série est valide pour l'autre analyte, ces résultats peuvent être utilisés dans l'analyse de données avec la série valide répétée du premier analyte.

B. Validité de l'échantillon

Dans une série valide, des résultats d'échantillons individuels peuvent être jugés **INVALID** (NON VALIDES) et seront alors indiqués dans le Rapport sur la série brute (voir *Interprétation des résultats*). Bien que les réplicats individuels d'un échantillon puissent être valides, un échantillon sera non validé si la différence interpolée en c/mL entre les réplicats dépasse 600 %. Le test de l'échantillon doit être répété pour cet analyte.

Interprétation des résultats

A. Types de rapports

1. Rapport sur la série brute

   Le Rapport sur la série brute fournit des informations sur la validité de la série **PASS** (REUSSITE) ou **FAIL** (ECHEC) ; voir *Procédures de contrôle de qualité*) et sur les tubes réactionnels individuels testés avec le test Progensa PCA3. Si la série n'est pas valide **FAIL** (ECHEC), tous les tubes de cette série seront marqués comme non valides. Toutefois, des tubes individuels peuvent être jugés non valides dans une série valide **PASS** (REUSSITE). Pour les séries consécutives (autrement dit, lorsque les analytes PCA3 et PSA sont testés dans une même série), une série d'analyte peut être non valide alors que l'autre série est valide.

   Le Résumé des exceptions se trouve à la fin du Rapport sur la série brute. Dans le cas de séries consécutives dans lesquelles les deux séries d'analytes sont valides, les prélèvements figurant dans le Résumé des exceptions peuvent nécessiter une reprise du test pour l'un des analytes. Bien qu'un résultat de PCA3 Score puisse figurer dans le Résumé des exceptions, ce résultat n'est pas considéré utilisable dans un rapport tant que la correspondance manuelle n'a pas été effectuée et que le résultat ne figure pas dans le Rapport sur les ratios. Si un seul analyte a été testé ou si une série d'analyte n'est pas valide, tous les échantillons testés figureront dans le Résumé des exceptions.

2. Rapport sur les ratios

   Le logiciel de test génère automatiquement un Rapport sur les ratios lors des séries consécutives où les deux séries d'analyte sont valides. Le logiciel calcule et donne le PCA3 Score des prélèvements dans le Rapport sur les ratios. Les prélèvements figurant dans le Rapport sur les ratios ne nécessitent pas de test supplémentaire, ou alors ce sont les deux analytes qui doivent être testés à nouveau. Les prélèvements ne figurant pas dans le Rapport sur les ratios sont indiqués dans la partie Résumé des exceptions du Rapport sur la série brute.

   Il est possible de générer un Rapport sur les ratios après une correspondance manuelle (voir *Mise en correspondance manuelle* pour de plus amples informations).

3. Rapport QC

   Le Rapport QC donne les critères de validité de la série du test, les concentrations assignées et interpolées, ainsi que les récupérations des calibrateurs et contrôles. Ce rapport indique également les paramètres qui définissent la courbe de calibration de la réponse à la dose logistique (3) à quatre paramètres. Pour de plus amples renseignements, consultez le *Manuel de l'opérateur du logiciel de test Progensa PCA3*.

B. Mise en correspondance

1. Mise en correspondance automatique

   Dans les séries consécutives où les deux séries d'analyte sont valides, le logiciel établit automatiquement la correspondance des résultats des analytes PCA3 et PSA des échantillons testés et détermine le PCA3 Score (s'il est calculable). Les résultats figurent dans le Rapport sur les ratios ou dans le Résumé des exceptions du Rapport sur la série brute.

2. Mise en correspondance manuelle

   Si les analytes PCA3 et PSA sont testés dans des séries différentes, le logiciel n'est pas en mesure de déterminer automatiquement le PCA3 Score. La mise en correspondance

manuelle des résultats des analytes est donc nécessaire pour déterminer le PCA3 Score ou la fourchette du PCA3 Score (consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'opérateur du logiciel de test Progensa PCA3*). La mise en correspondance manuelle peut aussi être nécessaire pour les résultats figurant dans le Résumé des exceptions du Rapport sur la série brute. Après la mise en correspondance manuelle, le ou les PCA3 Score(s) pour le ou les prélèvements mis en correspondance figureront dans un nouveau Rapport sur les ratios.

C. Interprétation des rapports

1. PCA3 Score

Remarque : Seuls les PCA3 Scores et les fourchettes des PCA3 Scores figurant dans le Rapport sur les ratios sont utilisables dans un rapport. *Les résultats apparaissant dans le résumé des exceptions peuvent nécessiter une action supplémentaire et ne peuvent pas être utilisés dans un rapport.*

Le PCA3 Score est calculé comme ratio des copies RNA du PCA3 divisé par les copies RNA du PSA et multiplié par 1 000. Les PCA3 Scores ne peuvent être calculés qu'en utilisant les résultats des séries et échantillons valides. Les séries et échantillons non valides doivent être testés à nouveau pour l'analyte concerné (voir *Nouveau test* pour de plus amples informations).

Si le PCA3 Score validé est inférieur au seuil, le résultat doit être interprété comme étant NEGATIF. Si le PCA3 Score est supérieur ou égal au seuil, le résultat doit être interprété comme étant POSITIF. Le directeur du laboratoire établira le seuil (voir *Caractéristiques des performances* pour de plus amples informations).

Dans certaines conditions, une fourchette du PCA3 Score (>[PCA3 Score calculé] ou <[Score calculé]) est fournie. Si le <[PCA3 Score calculé] est inférieur au seuil, le résultat doit être interprété comme étant NEGATIF. Si le >[PCA3 Score calculé] est supérieur au seuil, le résultat doit être interprété comme étant POSITIF. S'il faut une valeur numérique, la dilution et la reprise de test de l'échantillon peuvent produire un PCA3 Score au lieu d'une fourchette de PCA3 Score (voir *Nouveau test - Dilution des échantillons fortement hors normes*).

2. Interprétation des codes d'état et d'analyse

La colonne Etat du Rapport sur la série brute et du Rapport sur les ratios donne des informations en format « s:a ». Les codes d'état spécifiques à la série (« s ») sont indiqués avant les deux points (à gauche) et les codes d'analyte spécifiques à la série (« a ») figurent après les deux points (à droite). Les codes spécifiques aux analytes sont donnés en minuscules pour les résultats du PCA3 et en majuscules pour ceux du PSA. Chaque rapport contient les descriptions des codes d'état et d'analyse figurant dans celui-ci. Par exemple, les codes peuvent indiquer si un résultat d'échantillon ou de réplicat est valide ou hors normes. Consultez le *Guide de référence rapide* ou le *Manuel de l'opérateur du logiciel de test Progensa PCA3* pour une liste complète des codes d'état et d'analyse et pour de plus amples détails.

Si un PCA3 Score est indiqué dans le Rapport sur les ratios et qu'aucun code d'état ou d'analyse ne figure dans les colonnes Etat PCA3 ou PSA, ceci indique que les deux analytes testés sont valides et « dans les normes ». Le résultat de l'échantillon est utilisable dans un rapport et aucune action supplémentaire n'est nécessaire.

Si un code d'état ou d'analyse figure dans le Résumé des exceptions ou le Rapport sur les ratios, il peut être nécessaire d'effectuer un deuxième test (voir *Interprétation des résultats du Résumé des exceptions* et *Interprétation des résultats du Rapport sur les ratios*). Si des résultats d'analyte proviennent de série distinctes et qu'ils sont accompagnés d'un ou plusieurs codes d'analyse,

recherchez la combinaison des deux analytes dans le Tableau 4 ou le Tableau 5 pour déterminer si une action supplémentaire est nécessaire.

Remarque : *La présence d'un code d'état ou d'analyse ne signifie pas automatiquement qu'il faille effectuer un deuxième test.*

3. Interprétation des résultats du Résumé des exceptions

   Le Résumé des exceptions peut n'indiquer aucun échantillon. Si tel est le cas, aucune autre action n'est nécessaire.

   Si le Résumé des exceptions indique un ou plusieurs échantillons pour des séries consécutives dans lesquelles les deux séries d'analyte sont valides, référez-vous aux instructions du Tableau 4.

   Pour les séries d'analyte individuelles, référez-vous à *Interprétation des codes d'état et d'analyse*. Dans les séries consécutives où une série d'analyte n'est pas valide, testez une seconde fois la série invalide (voir *Nouveau test* pour de plus amples informations) et traitez les résultats comme s'il s'agissait de séries d'analyte individuelles. Une mise en correspondance manuelle sera alors nécessaire.

   Un échantillon peut être désigné comme non valide alors que les tubes individuels (réplicats) seront désignés comme valides. C'est le résultat combiné des réplicats qui détermine la validité des échantillons, et toute différence importante entre réplicats a pour effet d'invalider un échantillon (voir *Procédures de contrôle de qualité* pour de plus amples informations).

Tableau 4 : Conditions du Résumé des exceptions du test Progensa PCA3

Résultat PCA3 (Code d'analyse*)	Résultat PSA (Code d'analyse*)	PCA3 Score listé	Test supplémentaire ?	Action/commentaire
Dans la fourchette (pas de code)	Non valide** (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Reprenez le test de PSA (voir *Nouveau test*) et établissez manuellement la correspondance des résultats.
Faiblement hors normes (g)	Non valide (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Reprenez le test de PSA (voir *Nouveau test*) et établissez manuellement la correspondance des résultats.
Non valide (a, b, e, h, ou i)	Dans la fourchette (pas de code)	--	Oui	Testez à nouveau le PCA3 (voir *Nouveau test*) et établissez manuellement la correspondance des résultats.
Dans la fourchette (pas de code)	Fortement hors normes (F)	<[PCA3 Score calculé]***	Optionnel	1. Faites une correspondance manuelle pour obtenir le <[PCA3 Score calculé] OU 2. Diluez l'échantillon dans un diluant d'échantillon (voir *Dilution des échantillons fortement hors normes*), retestez le PSA et mettez manuellement les résultats en correspondance si un PCA3 Score est requis.
Fortement hors normes (f)	Dans la fourchette (pas de code)	>[PCA3 Score calculé]	Optionnel	1. Faites une correspondance manuelle pour obtenir le >[PCA3 Score calculé] OU 2. Diluez l'échantillon dans un diluant d'échantillon, retestez le PCA3 et mettez manuellement les résultats en correspondance si un PCA3 Score est requis.
Faiblement hors normes (g)	Dans la fourchette (pas de code)	<[PCA3 Score calculé]	Non	Faites une correspondance manuelle pour obtenir le <[PCA3 Score calculé].
Faiblement hors normes (g)	Fortement hors normes (F)	<[PCA3 Score calculé]	Non	Faites une correspondance manuelle pour obtenir le <[PCA3 Score calculé].

Tableau 4 : Conditions du Résumé des exceptions du test Progensa PCA3 (suite)

*Consulter le *Manuel d'utilisation du logiciel de test Progensa PCA3* pour une liste complète des codes d'analyse.
**S'applique uniquement aux échantillons non valides d'une série valide.
***Pour les valeurs hors normes, le PCA3 Score calculé est obtenu en utilisant le taux de copie du calibrateur positif le plus proche.

4. Interprétation des résultats du Rapport sur les ratios

   Si un prélèvement figure dans le Rapport sur les ratios accompagné d'un PCA3 Score, le résultat est un PCA3 Score utilisable dans un rapport et aucune action supplémentaire n'est nécessaire. Si aucun PCA3 Score n'est listé, exprimé sous la forme « -- » dans la colonne PCA3 Score, se référer aux instructions du Tableau 5.

Tableau 5 : Conditions du Rapport sur les ratios du test Progensa PCA3

Résultat PCA3 (Code d'analyse*)	Résultat PSA (Code d'analyse*)	PCA3 Score listé	Test supplémentaire ?	Action/commentaire
Dans la fourchette (pas de code)	Dans la fourchette (pas de code)	PCA3 Score	Non	Aucune action supplémentaire ; le résultat peut être utilisé dans un rapport.
Non valide** (a, b, e, h, ou i)	Non valide (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Testez à nouveau les deux analytes (voir *Nouveau test*).
Non valide (a, b, e, h, ou i)	Fortement hors normes (F)	--	Oui	Diluez l'échantillon dans le diluant d'échantillon (voir *Dilution des échantillons fortement hors normes*) et testez à nouveau les deux analytes.
Fortement hors normes (f)	Non valide (A, B, E, H, ou I)	--	Oui	Diluez l'échantillon dans le diluant d'échantillon et testez à nouveau les deux analytes.
Fortement hors normes (f)	Fortement hors normes (F)	--	Oui	Diluez l'échantillon dans le diluant d'échantillon et testez à nouveau les deux analytes.
Non valide (a, b, e, h, ou i)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.
Dans la fourchette (pas de code)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.
Fortement hors normes (f)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.
Faiblement hors normes (g)	Faiblement hors normes (G)	--	Non	L'échantillon ne contient pas suffisamment de RNA pour des analyses précises. Un nouvel échantillon doit être collecté auprès du patient.

*Consulter le *Manuel d'utilisation du logiciel de test Progensa PCA3* pour une liste complète des codes d'analyse.
**S'applique uniquement aux échantillons non valides d'une série valide. Si des échantillons ne sont pas valides parce qu'une série n'était pas valide, les résultats figureront dans le Résumé des exceptions (voir *Interprétation des résultats du Résumé des exceptions* pour de plus amples informations).

D. Nouveau test

1. Directives pour effectuer un deuxième test
    a. Bien qu'il ne soit pas impératif que les deux analytes soient testés dans la même série, **les résultats des deux analytes doivent venir du même flacon d'échantillon pour obtenir un PCA3 Score pouvant être utilisé dans un rapport**.
    b. Toutes les séries non valides doivent être reprises, ainsi que tous les échantillons non valides des séries valides.
    c. Testez à nouveau le ou les échantillons en utilisant un nouveau jeu de calibrateurs et de contrôles.
    d. La conservation adéquate du surplus de l'échantillon avant tout nouveau test est essentielle (voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples informations).
    e. Une correspondance manuelle des analytes PCA3 et PSA peut être nécessaire pour déterminer le PCA3 Score (voir *Mise en correspondance manuelle* pour de plus amples informations).
2. Dilution des échantillons fortement hors normes
    a. Si la concentration extrapolée d'un échantillon est supérieure à la valeur du Calibrateur 5 dans une série valide, le résultat est « fortement hors normes » et sera accompagné d'un code d'analyse « f » ou « F » (échec) dans le ou les rapports sur la série. La concentration sera exprimée sous la forme >[Concentration Calibrateur 5].
    b. Inversez l'échantillon d'urine traité pour le mélanger avant la dilution de l'échantillon. La dilution recommandée, mais non requise, est de 1/10 en utilisant le test Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. Dans un flacon approprié, ajoutez 1 800 µL de diluant d'échantillon et 200 µL d'échantillon ; rebouchez le tube et retournez-le cinq fois pour obtenir un mélange homogène. Le facteur de dilution sera de « 10 » dans la liste de travail de la série. Si les deux analytes doivent être testés à nouveau, doublez les volumes (utilisez 3 600 µL de diluant d'échantillon et 400 µL d'échantillon). Consultez la notice du Progensa PCA3 Specimen Diluent Kit. Testez l'échantillon dilué avec le test.
    c. Si, après ce nouveau test, les résultats de l'échantillon sont toujours fortement hors normes, continuez à diluer l'échantillon jusqu'à ce que les résultats soient interpolés dans la fourchette du calibrateur si nécessaire. Une dilution supplémentaire de la dilution initiale au 1/10 est permise sous réserve que la solution initiale au 1/10 ait été correctement conservée (voir *Collecte, transport et conservation des échantillons* pour de plus amples informations).

Limites

A. Le test Progensa PCA3 ne devrait pas être utilisé chez les patients prenant des médicaments connus pour affecter les taux de PSA sérique tels que le finastéride (Proscar, Propecia), le dutastéride (Avodart), et suivant une thérapie anti-androgène (Lupron). L'effet de ces médicaments sur l'expression du gène PCA3 n'a pas encore été évalué.

B. Certaines procédures thérapeutiques et de diagnostic telles qu'une prostatectomie, des rayons, une biopsie de la prostate et autres peuvent affecter la viabilité des tissus prostatiques et altérer ainsi le PCA3 Score. L'effet de ces procédures sur la performance du test n'a pas été encore évalué. Les échantillons destinés au test PCA3 doivent être collectés lorsque le clinicien estime que les tissus prostatiques ont récupéré.

C. L'utilisation du test Progensa PCA3 est limitée au personnel ayant été formé à la procédure. Le non-respect des instructions figurant dans cette notice peut donner lieu à des résultats erronés.

D. Chaque laboratoire devra valider indépendamment un processus de transfert LIS.

E. La fiabilité des résultats dépend de la qualité de la collecte des échantillons d'urine. Etant donné que le système de transport utilisé pour le test Progensa PCA3 ne permet pas l'évaluation microscopique de la qualité des échantillons d'urine, il est nécessaire que les cliniciens soient formés aux techniques de collecte d'échantillons d'urine appropriées. Voir *Collecte, transport et conservation des échantillons*. Pour des informations plus détaillées, référez-vous à la notice de test fournie avec le Progensa PCA3 Urine Specimen Transport Kit.

F. Les résultats du test Progensa PCA3 doivent être interprétés en conjonction avec les autres données de laboratoire et cliniques dont dispose le clinicien. (Les résultats des tests peuvent être affectés par une collecte impropre des échantillons, une erreur technique ou une confusion entre échantillons.)

Caractéristiques des performances

A. Résultats cliniques

1. Sensibilité et spécificité diagnostiques

   Les caractéristiques de performance du test Progensa PCA3 ont été établies en utilisant les échantillons de sujets de quatre sites cliniques géographiquement diversifiés en Amérique du Nord. La population de sujets consistait en 529 hommes prévus pour une biopsie de la prostate. Les données démographiques des sujets sont indiquées ci-dessous :

   a. Moyenne d'âge ± ET = 64 ± 8 ans (médiane 63, fourchette de 32 à 89)
   b. Taux moyen de PSA sérique = 7,9 ± 21,9 µg/L (5,6 ; 0,3 à 484)
   c. Volume prostatique moyen (déterminé par une ultrasonographie transrectale) = 44 ± 25 cc (39, 5 à 225)
   d. 34 % (180/529) de biopsies positives pour le cancer de la prostate

Figure 3 Le indique la corrélation du PCA3 Score avec la probabilité de biopsies positives. Plus le PCA3 Score augmente, plus le nombre de biopsies cancéreuses positives chez les sujets augmente.

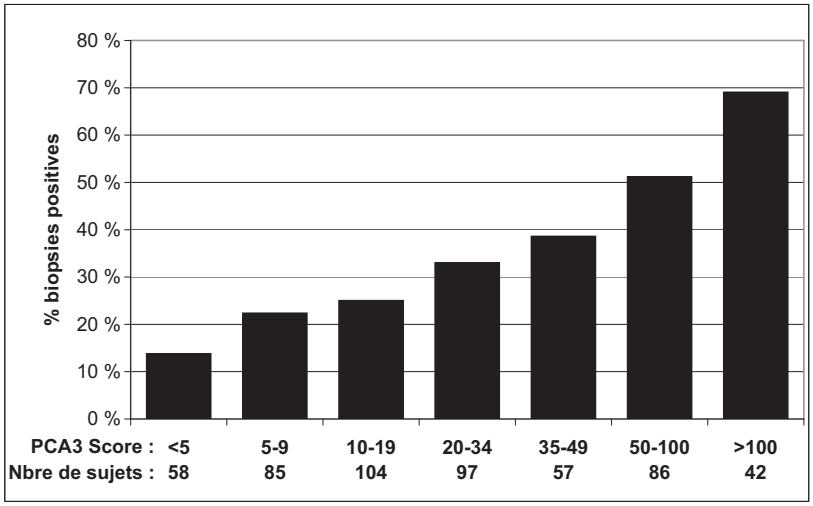

Figure 3. Corrélation du PCA3 Score avec la probabilité de biopsies positives

L'analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (ROC) a été effectuée en utilisant la biopsie de la prostate comme méthode de référence, conformément à CLSI GP10-A (1995) (4). Pour le test Progensa PCA3, la zone sous la courbe (AUC) était de 0,685 (intervalle de confiance de 95 % = 0,637 à 0,733). Tableau 6 Le donne la sensibilité et la spécificité diagnostiques pour différents seuils du PCA3 Score. Chaque laboratoire devra établir les seuils de sensibilité ou spécificité diagnostiques (voir *Interprétation des résultats*).

Tableau 6 : Sensibilité et spécificité diagnostiques du test Progensa PCA3 pour différents seuils du PCA3 Score

Seuil du PCA3 Score	5	10	15	25	35	50	95
Sensibilité	96 %	85 %	77 %	63 %	53 %	41 %	17 %
Spécificité	14 %	33 %	47 %	61 %	74 %	84 %	95 %

2. Etudes de la stabilité des échantillons

   a. Stabilité dans l'urine non centrifugée : L'urine de premier jet a été recueillie chez 10 sujets et conservée entre 2 °C et 8 °C ou à 30 °C avant d'être traitée par

l'ajout de moyen de transport d'urine (UTM). A des températures comprises entre 2 °C et 8 °C, une dégradation significative du RNA de PCA3 et de PSA a été observée dans certains échantillons au bout de 4 heures. L'urine non centrifugée doit donc être traitée dans les 4 heures. A 30 °C, une dégradation significative a été observée en moins d'une heure. L'urine non centrifugée doit donc être toujours réfrigérée ou conservée sur de la glace avant la réalisation des tests.

b. Stabilité dans l'urine traitée : Douze échantillons ont été incubés à 4 °C ou 30 °C jusqu'à 38 jours. À 4 °C, le RNA de PCA3 et de PSA était stable pendant 21 jours ; à 30 °C il était stable pendant 5 jours. Les échantillons conservés entre -20 °C et -70 °C ont fait preuve d'une stabilité de RNA de PCA3 et de PSA jusqu'à 90 jours.

c. Stabilité du cycle de congélation-décongélation : Les échantillons ont été soumis 6 fois à des cycles compris entre 37 °C et -70 °C. Aucune diminution dans les taux de copie de RNA de PCA3 ou de PSA n'a été observée.

B. Résultats analytiques

1. Sensibilité analytique

Un panel de sensibilité analytique composé d'un transcrit RNA dilué *in vitro* a été utilisé pour évaluer la sensibilité du test. Un opérateur a testé le panel sur douze séries de cinq réplicats en utilisant un seul lot de réactifs. La limite de détection et la limite de quantification ont été calculées conformément à CLSI EP17-A (2004) (5). La limite de détection de l'analyte PCA3 a été de 80 c/mL, et de 1 438 c/mL pour l'analyte PSA. Le Calibrateur 2 a représenté la limite de quantification des deux analytes.

2. Spécificité analytique

a. Transcrit non épissé : Le test Progensa PCA3 a été conçu pour détecter uniquement le RNA de PCA3 épissé des exon 3-exon 4 spécifiques au cancer de la prostate (2). Le test n'a pas détecté le 1 million c/mL de RNA de PCA3 non épissé de manière significative au-dessus du bruit de fond.

b. Spécificité prostatique du RNA de PCA3 dans l'urine : Les échantillons de sujets ayant subi une prostatectomie radicale (n = 97) ont été testés avec le test Progensa PCA3 et les taux de RNA de PCA3 ont été comparés à ceux de ces sujets avant la biopsie (n = 464). La médiane c/mL du RNA de PCA3 était inférieure à la limite de détection du test pour les échantillons des sujets ayant subi une prostatectomie, alors que la médiane c/mL du RNA de PCA3 des échantillons de sujets avant la biopsie était de 7 243 c/mL ; ces données confirment que le RNA de PCA3 dans l'urine vient de la prostate.

c. Spécificité des tissus : Le RNA total a été extrait des tissus de deux donneurs mâles uniques par type tissulaire, ajouté au diluant d'échantillon (10 ng par réaction) et analysé avec le test Progensa PCA3. Le tissu prostatique a été le seul type de tissu détecté au dessus de la limite de détection de RNA de PCA3 pour les types de tissus indiqués au Tableau 7.

Tableau 7 : Test du RNA de PCA3 sur différents types de tissus masculins

Type de tissu	
Vessie (normal)	Rein
Vessie (tumeur)	Pénis
Moelle osseuse	Prostate
Canal déférent	Vésicule séminale
Epididyme	Testicule

d. Substances interférentes : Les substances indiquées dans le Tableau 8 ont été ajoutées aux aliquotes des urines masculines groupées et traitées. Les échantillons ont été testés avec le test Progensa PCA3 conformément à CLSI EP7-A2 (2005) (6). Pour les concentrations indiquées, aucune interférence n'a été observée avec le test.

Tableau 8 : Substances testées pour l'interférence avec le test Progensa PCA3

Agents thérapeutiques	
Substance	**Concentrations testées**
Acétaminophène/Codéine	5,34 µmol/L
Atorvastatine	25 mg/L
Lisinopril	0,74 µmol/L
Amlodipine	245 µmol/L
Aténolol	37,6 µmol/L
Sulfasalazine	754 µmol/L
Esoméprazole	120 mg/L
Allopurinol	294 µmol/L
Diphénhydramine	19,6 µmol/L
Acétaminophène	1 324 µmol/L
Acide acétylsalicylique	3,62 mmol/L
Ibuprofène	2 425 µmol/L
Furosémide	181 µmol/L
Ciprofloxacine	30,2 µmol/L
Levaquin	48,6 µmol/L
Doxycycline	67,5 µmol/L
Hydrochloride de fluoxetine	11,2 µmol/L
Flutamide	1 500 mg/L
Dutastéride	1,5 mg/L

Agents thérapeutiques, suite	
Substance	**Concentrations testées**
Uroxatral	30 mg/L
Doxazosine	1,33 µmol/L
Térazosine	7,8 µmol/L
Finastéride	15 mg/L
Tamsulosine	1,2 µg/L
Metformine	310 µmol/L
Sildénafil	12,9 pmol/L
Chou palmiste nain	1 600 mg/L
Sélénium	0,275 mg/L

Constituants de l'urine	
Substance	**Concentrations testées**
Acide urique	1,4 mmol/L
Hémoglobine	2 g/L
Globules blancs	4,56 x 10^7 cellules/L
Globules rouges	3,06 x 10^7 cellules/L
Albumine	50 g/L
Bilirubine (non conjuguée)	342 g/L
IgG	60 g/L

3. Précision

La précision du test Progensa PCA3 a été évaluée conformément à CLSI EP15-A2 (2005) (7). Les transcrits RNA de PCA3 et de PSA ont été quantifiés par spectrophotométrie ultraviolette et visible, puis ajoutés à des urines féminines traitées et normales (pas de RNA de PCA3 ou de PSA détectable), et les concentrations mesurées dans le test Progensa PCA3. Le pourcentage de récupération (%) a été calculé comme ratio du c/mL mesuré divisé par le c/mL ajouté, multiplié par 100.

Tableau 9 : Récupération des copies du test Progensa PCA3

Analyte	Concentration connue, c/mL	Concentration mesurée, c/mL	% Récupération
PCA3	750	808	108 %
	7 500	7 618	102 %
	18 750	18 722	100 %
	75 000	70 287	94 %
PSA	20 000	23 684	118 %
	250 000	278 373	111 %
	500 000	599 941	120 %
	1 750 000	1 960 775	112 %

4. Linéarité et fourchette

L'échelle linéaire du test Progensa PCA3 a été déterminée conformément à CLSI EP6-A (2003) (8) en se basant sur l'analyse de la régression linéaire (méthode des plus petits carrés). Deux jeux de séries de dilution ont été préparés à partir des échantillons contenant de fortes concentrations de RNA de PCA3 et de PSA. Un jeu a été dilué dans de l'urine féminine traitée et un autre dans un diluant d'échantillon. Les dilutions s'étalaient sur la totalité de la fourchette du test, allant des calibrateurs positifs les plus élevés aux plus bas pour chaque analyte. Les résultats de test mesurés des deux analytes PCA3 et PSA ont montré une relation proportionnelle directe entre les dilutions testées et le c/mL de l'analyte signalé. Aucun effet de matrice de diluant significatif n'a été noté. Voir Figure 4.

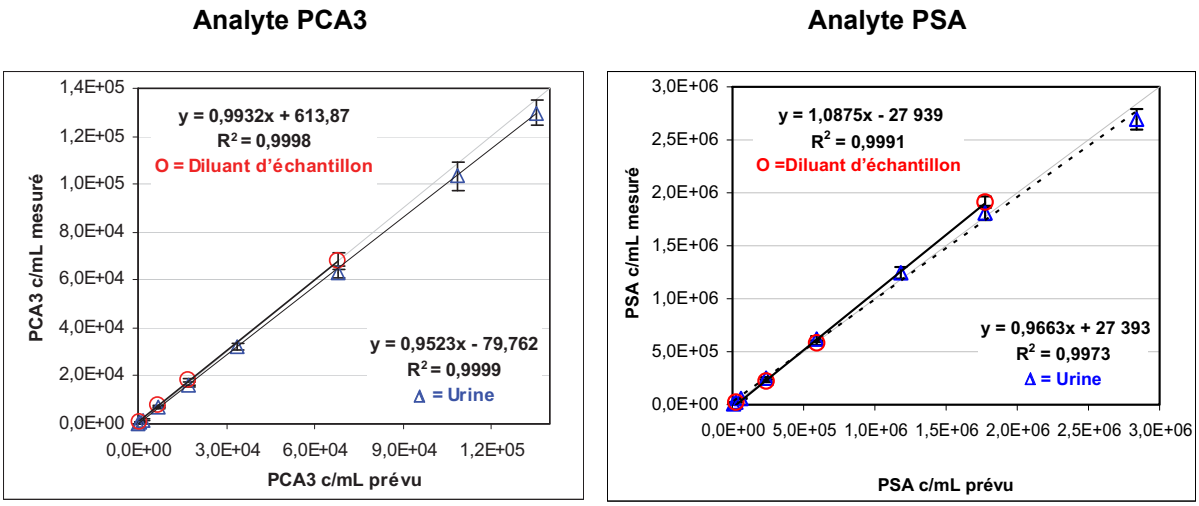

Figure 4. Linéarité du test Progensa PCA3 pour les analytes PCA3 et PSA

5. Exactitude

L'exactitude du test Progensa PCA3 a été évaluée conformément à CLSI EP5-A2 (2004) (9). La répétabilité correspond à l'exactitude dans des conditions de variabilité minimum, et la reproductibilité à l'exactitude dans des conditions de variabilité maximum.

Pour la répétabilité, un panel de test de 3 membres comprenant un transcrit RNA dilué *in vitro* a été préparé. L'opérateur d'un des sites a testé ce panel avec 20 séries de 5 réplicats pendant 20 jours en utilisant un seul lot de calibrateurs et de contrôles,

un lot de réactifs et un jeu de matériel. Tableau 10 Le montre l'exactitude de la répétabilité du test Progensa PCA3 aux différents taux de concentration testés.

Tableau 10 : Répétabilité du test Progensa PCA3

Analyte	Membre du panel	Moyenne c/mL	Répétabilité SD	Répétabilité CV
PCA3	1	1 228	145	12 %
	2	12 020	809	7 %
	3	61 108	2 489	4 %
PSA	1	48 091	3 715	8 %
	2	484 457	41 026	8 %
	3	2 001 430	131 554	7 %

Concernant la reproductibilité, un panel de test de 8 membres composé d'échantillons groupés (1 à 3) et un transcrit RNA dilué *in vitro* (4 à 8) a été préparé. Trois opérateurs ont testé ce panel au cours de 18 séries effectuées en 3 jours en utilisant un seul lot de calibrateurs et de contrôles, 3 lots de réactifs et 3 jeux de matériel. Tableaux 11 et 12 résument la précision totale, intra-série et inter-série, de l'opérateur, du matériel et du lot avec le test Progensa PCA3 pour le c/mL de l'analyte et le PCA3 Score.

Les variabilités intra-série, inter-opérateur et inter-série ont été, par ordre décroissant, les plus gros contributeurs à la variance générale du test. Le lot de réactif et le matériel ont peu contribué à la variance générale du test. Ces résultats prouvent que le test Progensa PCA3 se comporte de manière reproductible et que la source principale de variation est due aux erreurs aléatoires (intra-série).

Tableau 11 : Reproductibilité du test Progensa PCA3 : Analyse des copies/mL

Analyte	Membre du panel	n	Mesuré c/mL	CV total	CV intra-série	CV inter-série	CV inter-opérateur	CV inter-matériel	CV inter-lot
PCA3	1	36	248	27 %	24 %	7 %	15 %	11 %	0 %
	2	36	7 021	11 %	6 %	9 %	9 %	0 %	0 %
	3	36	31 469	8 %	6 %	5 %	9 %	0 %	4 %
	4	36	1 469	15 %	13 %	7 %	6 %	0 %	1 %
	5	36	14 844	7 %	5 %	2 %	6 %	0 %	4 %
	6	36	72 372	7 %	4 %	6 %	0 %	1 %	0 %
	7	36	430	26 %	26 %	0 %	11 %	0 %	1 %
	8	36	62 274	13 %	8 %	8 %	3 %	0 %	5 %
PSA	1	34	52 739	9 %	6 %	6 %	7 %	4 %	2 %
	2	34	218 789	10 %	6 %	7 %	7 %	4 %	0 %
	3	32	1 073 920	11 %	4 %	6 %	9 %	8 %	0 %
	4	34	37 185	9 %	5 %	7 %	3 %	0 %	1 %
	5	32	386 504	10 %	4 %	8 %	6 %	3 %	4 %
	6	34	1 518 748	12 %	5 %	8 %	4 %	3 %	7 %
	7	32	11 007	14 %	8 %	9 %	0 %	6 %	0 %
	8	34	1 694 404	11 %	7 %	7 %	0 %	1 %	6 %

Tableau 12 : Reproductibilité du test Progensa PCA3 : Analyse du PCA3 Score

Membre du panel*	n	Score moyen	CV total	CV intra-série	CV inter-série	CV inter-opérateur	CV inter-matériel	CV inter-lot
1	34	5	27 %	26 %	5 %	23 %	8 %	0 %
2	34	32	14 %	9 %	10 %	12 %	0 %	2 %
3	32	30	12 %	7 %	5 %	17 %	7 %	6 %
7	32	39	28 %	24 %	2 %	8 %	11 %	7 %
8	34	37	21 %	14 %	12 %	0 %	0 %	9 %

*Les membres 4 à 6 du panel contenaient uniquement le transcrit RNA de PCA3 ou de PSA et n'ont donc pas été inclus dans cette analyse.

Bibliographie

1. **Bussemakers, M.J.G., A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs.** 1999. DD3: A New Prostate-Specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. Cancer Res. **59**:5975-5979.
2. **Hessels, D., J.Mt. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H.F.M. Karthaus, G.J.L. van Leenders, B. van Balken, L.A. Kiemeney, J.A. Witjes, and J.A. Schalken**. 2003. DD3^{PCA3}-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. European Urology. **44**:8-16.
3. **Groskopf J., S.M. Aubin, I.L. Deras, A. Blase, S. Bodrug, C. Clark, S. Brentano, J. Mathis, J. Pham, T. Meyer, M. Cass, P. Hodge, M.L. Macairan, L.S. Marks, and H. Rittenhouse.** 2006. Aptima PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. Clin Chem. **52**:1089-95.
4. **CLSI**. 1995. CLSI document GP10-A, Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic (ROC) Plots. CLSI, Wayne, PA.
5. **CLSI.** 2004. CLSI document EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. CLSI, Wayne, PA.
6. **CLSI**. 2005. CLSI document EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI, Wayne, PA.
7. **CLSI**. 2005. CLSI document EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness. CLSI, Wayne, PA.
8. **CLSI**. 2003. CLSI document EP6-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. CLSI, Wayne, PA.
9. **CLSI**. 2004. CLSI document EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. CLSI, Wayne, PA.

Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 États-Unis

Service clients: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com
Service technique: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Pour obtenir des coordonnées supplémentaires, visitez le site www.hologic.com.

EC REP

EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, La Haie
Pays-Bas

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Progensa, et SB100 sont des marques commerciales et/ou des marques déposées d'Hologic, Inc. et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.
eppendorf (stylisé) et REPEATER sont des marques de commerce de Eppendorf AG
RAININ est une marque de commerce de Rainin Instrument, LLC.
TECAN et FREEDOM EVO sont des marques de commerce de Tecan Group AG.

Toutes les autres marques commerciales qui peuvent apparaître dans ce notice sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

©2006 – 2014 Hologic, Inc. Tous droits réservés.

501377FR Rév. 001

2014-11